



FACULDADE DE  
MEDICINA DENTÁRIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto**

**Efeito antifúngico de cones de guta-percha revestidos com nanopartículas de dióxido de titânio**

Ricardo Picão Fernandes

rpf3ricardo@hotmail.com

Monografia de Investigação submetida à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto para obtenção do grau Mestre em Medicina Dentária

**Orientadora** | Professora Doutora Irene Pina Vaz

Professora Associada com Agregação da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

**Coorientadora** | Professora Doutora Maria Helena Raposo Fernandes

Professora Catedrática da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Porto, 2017

*“Nada existe tão alto que o homem,  
com força de vontade,  
não possa apoiar a sua escada.”*

***Friedrich Schiller***

## Agradecimentos

---

À minha Orientadora, Professora Doutora Irene Pina Vaz, um muito obrigado por todo seu tempo, dedicação, apoio e disponibilidade incansável. Por toda a sua boa disposição, até mesmo nos momentos mais aflitivos, calma e paciência. Por todos os momentos de partilha, enriquecimento e oportunidades abertas.

À minha Coorientadora, Professora Doutora Maria Helena Fernandes, pela sua disponibilidade, ajuda e recetividade.

À Doutora Liliana Grenho, por toda a paciência, colaboração e cortesia com que sempre me recebeu. Por toda ajuda que foi essencial para concretização deste projeto.

Ao Doutor Joel Borges e à Dr<sup>a</sup> Cláudia Lopes e a todos os restantes elementos do Laboratório de Revestimentos Finos da UM, pela vossa recetividade, integração e disponibilidade total, que foram determinantes para que este processo ganhasse forma.

À Maria João, por toda ajuda, dedicação, colaboração e apoio prestado desde o início.

Aos meus pais, por serem um dos meus maiores pilares, por todo o apoio de sempre, por toda a determinação, compreensão, carinho e todo o amor com que sempre me abraçam.

Aos meus irmãos, por estarem sempre comigo ao longo desta caminhada, por todos os vossos sorrisos, afetos, motivação e persistência que me vão fazendo ultrapassar cada nova etapa.

Aos meus tios, que me acolheram como um filho durante este período académico, por toda a vossa amabilidade e apoio incondicional prestado desde o início.

À minha família, por toda a vossa animação, compreensão e partilha que aos longos dos anos me deram e me fazem crescer cada vez mais.

Aos meus amigos, um muito obrigado por estarem sempre nos momentos mais importantes, por toda a vossa diversão, companheirismo e apoio. Levo-vos sempre comigo.

## Índice

---

|   |             |
|---|-------------|
| <b>RESUMO .....</b>   | <b>VIII</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>X</b>    |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>1</b>    |
| <b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>3</b>    |
| 2.1 Esterilização por óxido de Etileno .....  | 4           |
| 2.2 Tratamento com plasma .....   | 4           |
| 2.3 Revestimento com filme fino de TiO <sub>2</sub> .....                                     | 6           |
| 2.3.1 Procedimento revestimento com filme fino de dióxido de Titânio (TiO <sub>2</sub> )..... | 7           |
| 2.4 Imersão em hipoclorito de sódio a 2,5 % .....   | 8           |
| 2.5 Análise Microbiológica .....  | 9           |
| 2.6 Análise de Citocompatibilidade (Método Direto) .....                                      | 10          |
| 2.7 Análise de Citocompatibilidade (Método Indireto).....                                     | 11          |
| 2.8 Análise Estatística .....   | 11          |
| <b>3. RESULTADOS.....</b>   | <b>12</b>   |
| 3.1 Análise Microbiológica .....  | 12          |
| 3.2 Análise de Citocompatibilidade (Método Direto) .....                                      | 14          |
| 3.3 Análise de Citocompatibilidade (Método Indireto).....                                     | 16          |
| <b>4. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>18</b>   |
| <b>5. CONCLUSÃO .....</b>   | <b>22</b>   |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>23</b>   |
| <b>7. ANEXOS .....</b>  | <b>27</b>   |

## Índice de Gráficos

---

|  |    |
|--|----|
| <b>Gráfico 1-</b> Crescimento planctónico de <i>C. albicans</i> na presença de cones de guta-percha avaliado por resazurina (RFUs- Relative Fluorescence Units ; ** $p < 0,05$ em relação aos grupo 4 e 6 )..... | 12 |
| <b>Gráfico 2-</b> Crescimento séssil de <i>C. albicans</i> na presença de cones de guta-percha avaliado por UFC/ml (* $p < 0,05$ em relação ao grupo 1 – grupo cones convencionais sem revestimento) ....        | 13 |
| <b>Gráfico 3-</b> Crescimento séssil de <i>C. albicans</i> na presença de cones de guta-percha avaliado por resazurina (RFUs- Relative Fluorescence Units).....  | 13 |
| <b>Gráfico 4-</b> Atividade metabólica das células fibroblásticas L 929, após 1, 2 e 5 dias em contacto com os cones de guta-percha, avaliada por MTT a 550 nm.....  | 14 |
| <b>Gráfico 5-</b> Atividade metabólica das células fibroblásticas L 929, após contacto com lixiviado de 1h e 24h - Dia 1 (Avaliação por MTT a 550nm, * $p < 0,05$ em comparação com cones grupo 1) .....         | 16 |
| <b>Gráfico 6-</b> Atividade Metabólica das células fibroblásticas L 929, após contacto com lixiviado 1h e 24h – Dia 2 (Avaliação por MTT a 550 nm ,* $p < 0,05$ em comparação com cones grupo 1) .....           | 17 |
| <b>Gráfico 7-</b> Atividade Metabólica das células fibroblásticas L 929, após contacto com lixiviado 1h e 24h – Dia 5 (Avaliação por MTT a 550 nm).....  | 17 |

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Equipamento para tratamento de plasma ( <i>Diener Electronics, modelo Zepto</i> ) .....  | 4  |
| <b>Figura 2</b> – Porta - substratos construído para transporte de cones de guta-percha.....   | 5  |
| (A) Confeção porta-substratos; (B) Cones dispostos no porta-substratos durante o tratamento de plasma. ....  | 5  |
| <b>Figura 3</b> – Esquema de tratamento com plasma de Árgon sob a superfície cone de guta-percha   | 5  |
| (A) Superfície do cone antes do tratamento de plasma; (B) Superfície do cone durante o tratamento de plasma (Eliminação dos átomos de carbono durante o tratamento com plasma de árgon); (C) Superfície do cone após tratamento de plasma de Árgon (Superfície descontaminada). Adaptado de: <a href="https://plasmatrement.co.uk/henniker-plasma-technology/plasma-surface-technology/plasma-technology-what-is-plasma-treatment/plasma-cleaning/">https://plasmatrement.co.uk/henniker-plasma-technology/plasma-surface-technology/plasma-technology-what-is-plasma-treatment/plasma-cleaning/</a> ..... | 5  |
| <b>Figura 4</b> – Câmara de deposição de filme fino de TiO <sub>2</sub> , do Laboratório de Revestimentos Finos (LRF-III) do Departamento/Centro de Física da Universidade do Minho .....  | 7  |
| (A) Vista externa da câmara de deposição; (B) Vista interna da câmara de deposição, com o porta-substrato e cones de guta-percha .....   | 7  |
| <b>Figura 5</b> – Esquema de deposição de filme fino de TiO <sub>2</sub> . Adaptado de: <a href="http://www.m-system.co.jp/newsletter/182/clip_contents.html">http://www.m-system.co.jp/newsletter/182/clip_contents.html</a> .....  | 8  |
| <b>Figura 6</b> – Cones de guta-percha sobre gaze esterilizada após imersão em NaOCl 2,5% .....  | 9  |
| <b>Figura 7</b> – Meio preparado de $\alpha$ -MEM. ....  | 10 |
| <b>Figura 8</b> – Cones de guta-percha em solução de PBS, distribuídos pelos diferentes time points 1h e 24 h.....   | 11 |
| <b>Figura 9 (A)</b> – Cone guta-percha convencional após ensaio MTT- Dia 1 (ampliação 10x) .....   | 15 |
| <b>Figura 9 (B)</b> – Cone guta-percha convencional após ensaio MTT- Dia 2 (ampliação 10x) .....   | 15 |
| <b>Figura 9 (C)</b> – Cone guta-percha convencional após ensaio MTT- Dia 5 (ampliação 10x) .....   | 15 |
| <b>Figura 10 (A)</b> – Cone guta-percha com tratamento de plasma e revestimento com TiO <sub>2</sub> após ensaio MTT- Dia 1 (ampliação 10x).....   | 15 |
| <b>Figura 10 (B)</b> – Cone guta-percha com tratamento de plasma e revestimento com TiO <sub>2</sub> após ensaio MTT- Dia 2 (ampliação 10x).....   | 15 |
| <b>Figura 10 (C)</b> – Cone guta-percha com tratamento de plasma e revestimento com TiO <sub>2</sub> após ensaio MTT – Dia 5 (ampliação 10x) .....   | 15 |

## Índice de Tabelas

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela I</b> - Tabela resumo do número de cones distribuídos por cada grupo.....   | 3  |
| <b>Tabela II</b> - Condições aplicadas no sistema de deposição de filme fino.....   | 6  |
| <b>Tabela III</b> – Tabela resumo com figuras representativas da adesão celular conferida pelo tratamento de plasma e revestimento de TiO <sub>2</sub> , em relação aos cones convencionais, pelos dias 1, 2 e 5..... | 15 |

## Índice de Siglas e Abreviaturas

---

**TiO<sub>2</sub>** – Dióxido de Titânio

**NP** – Nanopartículas

**GP** – Guta-Percha

**UFC** – Unidades Formadoras de Colônias

**EtO**- Óxido de Etileno

## RESUMO

---

### Introdução

Os cones de guta-percha (GP), podem ser contaminados por microrganismos quando manipulados ou expostos ao meio ambiente.

Deste modo, a intervenção do médico dentista poderá focar-se ao nível da esterilização ou desinfecção dos cones, promovendo assim a manutenção de uma cadeia asséptica e evitando futuras complicações. São propostos alguns meios de promoção da desinfecção destes materiais, desde soluções irrigadoras, como o hipoclorito de sódio ou então o revestimento destes com um material potencialmente inibidor da atividade microbiana.

### Objetivo

Avaliar a atividade antifúngica de cones de guta-percha revestidos com um filme fino de nanoparticulado de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) e a citocompatibilidade destes.

### Metodologia

186 cones (GP), 80, *Dentsply Maillefer*. Foram distribuídos em: Grupo 1- sem revestimento; Grupo 2- sem revestimento e imersão em solução de hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}$ ) a 2,5%; Grupo 3- tratamento de plasma; Grupo 4- tratamento de plasma e revestimento de  $\text{TiO}_2$ ; Grupo 5- tratamento de plasma e imersão em  $\text{NaOCl}$  2,5 % e Grupo 6- tratamento de plasma, revestimento de  $\text{TiO}_2$  e imersão em  $\text{NaOCl}$  a 2,5%. O tratamento de plasma de argon foi realizado em vácuo e o filme fino de  $\text{TiO}_2$  através de pulverização catódica. A avaliação do efeito antifúngico foi realizada através da exposição a *C. albicans* sendo as populações planctónicas e sésseis quantificadas através de UFC e ensaios com resazurina. A citocompatibilidade, foi avaliada em relação a células fibroblásticas (L929) e através de ensaios com MTT e microscopia.

A análise estatística utilizou os parâmetros de análises de variância com um nível de significância de 0,05.



## Resultados

Os cones com o revestimento de  $\text{TiO}_2$  demonstraram atividade antifúngica contra *Candida albicans*, sendo particularmente efetivos na inibição do crescimento de populações sésseis. Apresentaram um perfil de citotoxicidade semelhante ao controlo.

## Conclusão

O revestimento de cones de GP com filme fino de  $\text{TiO}_2$  revelou-se promissor na prevenção da contaminação deste material por uma população fúngica séssil. Este revestimento poderá contribuir para a manutenção da cadeia asséptica durante o tratamento endodôntico melhorando a taxa de sucesso e contribuindo para um melhor prognóstico.

## Palavras- Chave

*Revestimento guta-percha; desinfecção guta-percha; Candida albicans; nanopartículas de dióxido de titânio; deposição filme fino, infecção periapical*

## ABSTRACT

---

### Introduction

Gutta-percha cones (GP) can be contaminated by microorganisms when manipulated or exposed to the environment.

Accordingly, the intervention of the dentist may focus on the sterilization or disinfection of the cones, consequently promoting the maintenance of an aseptic chain and avoiding future complications. Some ways of disinfection of these materials are proposed, ranging from irrigation solutions, such as sodium hypochlorite, or the coating of these with a potentially inhibitory microbial activity material.

### Objective

Evaluate the antifungal activity of gutta-percha cones coated with a thin film of nanoparticulated titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>), and their cytocompatibility.

### Methods

186 cones (GP), 80, Dentsply Maillefer. They were distributed in: Group 1- control group; Group 2- uncoated and immersed in 2.5% sodium hypochlorite solution (NaOCl); Group 3 plasma treatment; Group 4 plasma treatment and TiO<sub>2</sub> coating; Group 5 plasma treatment and immersion in 2.5% NaOCl and Group 6 plasma treatment, TiO<sub>2</sub> coating and immersion in 2.5% NaOCl. The argon plasma treatment was performed under vacuum and the thin TiO<sub>2</sub> film by sputtering. The evaluation of the antifungal effect was performed exposure to *C. albicans*, with planktonic and sessile populations being quantified through CFU and resazurin assays. Cytocompatibility was evaluated in relation to fibroblast cells (L929) through MTT assay and microscopy.

Statistical analysis was performed using analysis of variance (level of significance at 0.05).

## Results

Cones coated with TiO<sub>2</sub> demonstrated antifungal activity against *Candida albicans*, being particularly effective in inhibiting the growth of sessile populations. They presented a similar cytotoxicity profile to the control.

## Conclusions

The coating of GP cones with TiO<sub>2</sub> thin films proved to be promising in preventing the contamination of this material by a sessile fungal population. This coating may contribute to the maintenance of the aseptic chain during endodontic treatment, improving the success rate and contributing to a better prognosis.

## Keywords

*Gutta-percha coating; gutta-percha disinfection; Candida albicans ; titanium dioxide nanoparticles; thin film deposition, periapical infection.*

## 1. INTRODUÇÃO

---

O principal objetivo do tratamento endodôntico (TE) visa a eliminação de microrganismos e a prevenção da reinfeção, do sistema de canais radiculares.<sup>(1-3)</sup>

Este tratamento está dividido em duas fases: a mecânica, que envolve a instrumentação dos canais associada a uma etapa química, com a utilização de soluções antimicrobianas como os agentes de irrigação.<sup>(2)</sup> A 2ª fase engloba a obturação e pretende manter as condições de assepsia obtidas pela preparação químico-mecânica e eliminar o espaço vazio dentro dos canais radiculares, preenchendo-o tridimensionalmente de modo a proporcionar um selamento o mais hermético possível, apical e coronalmente.<sup>(2, 4)</sup>

Os cones de guta-percha (GP) são o material de eleição para a obturação dos canais radiculares em associação a um cimento endodôntico. Contudo, não existem garantias que estes cones venham esterilizados nas embalagens dos fabricantes, podendo ser contaminados por microrganismos quando manipulados ou expostos ao meio ambiente. Os poucos estudos sobre este assunto, relatam que cerca de 5-8% de cones de GP retirados diretamente das caixas do fabricante antes da primeira utilização exhibe algum nível de contaminação.<sup>(5)</sup> Devido a isto, poderá ocorrer a formação de um biofilme resistente em torno do cone quebrando a cadeia asséptica e potenciando uma infeção secundária.<sup>(2, 4-10)</sup> Outros aspetos característicos dos cones GP, são a ausência de estabilidade dimensional e o fenómeno de contração que esta apresenta, que levam à criação de espaços na obturação permitindo assim a penetração de microrganismos.<sup>(8, 9)</sup>

As infeções endodônticas primárias estão associadas a uma maior diversidade microbiana, caracterizadas por um predomínio de bactérias anaeróbias estritas. No que diz respeito ao caso de infeções secundárias têm sido identificados microrganismos facultativos, como o *Enterococcus faecalis*, capaz de sobreviver em condições muito adversas, em mono-infeção e fungos, tais como a *Candida albicans*, implicados em infeções endodônticas refratárias ao tratamento convencional.<sup>(7, 11, 12)</sup>

A utilização de soluções de irrigação de hipoclorito de sódio (NaOCl) como meio de desinfecção é uma das práticas mais utilizadas pelo médico dentista. Segundo alguns autores, a *Candida albicans* demonstra suscetibilidade a qualquer concentração de NaOCl compreendida entre 0,5- 5%.<sup>(10, 13-15)</sup> Todavia, estudos têm demonstrado que a concentração de 2,5% NaOCl parece ser o melhor compromisso entre a eficiência e ausência de toxicidade/ risco de alteração de propriedades mecânicas.<sup>(16, 17)</sup>

Os revestimentos nanoparticulados, surgem como um meio alternativo de promoção de atividade antimicrobiana quando aplicados sobre um substrato. Estes revestimentos são utilizados em vários campos, nomeadamente da indústria alimentar, revestimentos de superfícies de aparelhos médicos ou até mesmo incorporados nas tintas comerciais, apresentando propriedades antimicrobianas e antifúngicas.<sup>(18-20)</sup> Destes, o revestimento de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) apresenta efeito antifúngico, nomeadamente contra a *Candida albicans*.<sup>(19, 21, 22)</sup>

As nanopartículas (NP) de  $\text{TiO}_2$  são reconhecidas como materiais bio-seguros pela FDA (Food and Drug Administration). As propriedades fotocatalíticas das nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  ajudam na promoção do efeito antibacteriano e antifúngico.<sup>(23-26)</sup>

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica de cones de guta-percha revestidos com um filme fino de nanoparticulado de dióxido de titânio e a citocompatibilidade desta nova proposta.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste estudo, utilizaram-se **186 cones guta-percha** tamanho 80 da marca *Dentsply Maillefer*.

Estes 186 cones foram distribuídos pelos 6 grupos de estudo (n=31), (**Tabela I**).

- 1) Cones sem revestimento- Controlo Positivo
- 2) Cones sem revestimento e imersão em NaOCl a 2,5%
- 3) Cones com tratamento de plasma
- 4) Cones com tratamento de plasma e revestimento de TiO<sub>2</sub>
- 5) Cones com tratamento de plasma e imersão em NaOCl a 2,5 %
- 6) Cones com tratamento de plasma, revestimento de TiO<sub>2</sub> e imersão em NaOCl a 2,5%

**Tabela I** - Tabela resumo do número de cones distribuídos por cada grupo.

| Grupos   | Análise Microbiológica |            | Citocompatibilidade |           | Cones Utilizados |
|--|------------------------|------------|---------------------|-----------|------------------|
|  | CFU                    | Resazurina | Direta              | Indireta  |                  |
| 1) Cones sem revestimento  | 3                      | 4          | 18                  | 6         | 31               |
| 2) Cones sem revestimento e imersão em NaOCl 2,5%  | 3                      | 4          | 18                  | 6         | 31               |
| 3) Cones com tratamento de plasma  | 3                      | 4          | 18                  | 6         | 31               |
| 4) Cones com tratamento de plasma e revestimento de TiO <sub>2</sub>                         | 3                      | 4          | 18                  | 6         | 31               |
| 5) Cones com tratamento de plasma e imersão em NaOCl 2,5%                                    | 3                      | 4          | 18                  | 6         | 31               |
| 6) Cones com tratamento de plasma, revestimento de TiO <sub>2</sub> e imersão em NaOCl 2,5 % | 3                      | 4          | 18                  | 6         | 31               |
| <b>Subtotal:</b>   | <b>18</b>              | <b>24</b>  | <b>108</b>          | <b>36</b> | <b>186</b>       |
| <b>Total cones:</b>  |                        |            |                     |           | <b>186</b>       |

## 2.1 Esterilização por óxido de Etileno

As amostras dos grupos 1, 2, 4 e 6 foram esterilizadas com óxido de etileno (EtO) nas instalações do Hospital de S. João do Porto. Foram submetidas a um ciclo de esterilização a 55°C, numa atmosfera de 100 % de EtO, durante 12 horas.

## 2.2 Tratamento com plasma

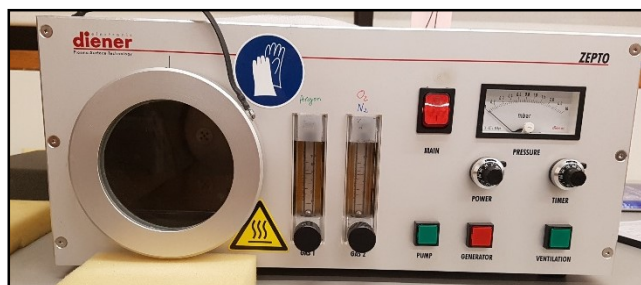
Os cones dos grupos 3 a 6 foram alvo de tratamento de plasma. O tratamento foi executado num equipamento *Diener Electronics* modelo *Zepto* (**Figura 1**) equipado com um gerador de plasma com frequência de 40 kHz e 100 W de potência máxima, com uma câmara cilíndrica interior de volume total de 2,6 dm<sup>3</sup> ( $\varnothing$  =105 mm, L=300 mm). Este equipamento funciona em condições de vácuo, com pressões inferiores a 20 Pa, obtido por recurso a uma bomba rotativa da *Pfeiffer Vacuum*, modelo *Duo 1.3*.<sup>(8)</sup>

Inicialmente procedeu-se à confeção de um porta-substratos, um meio de suporte para os cones de modo a que estes pudessem ser levados ao equipamento de tratamento de plasma e posteriormente à máquina de revestimentos de filmes finos (**Figura 2**).

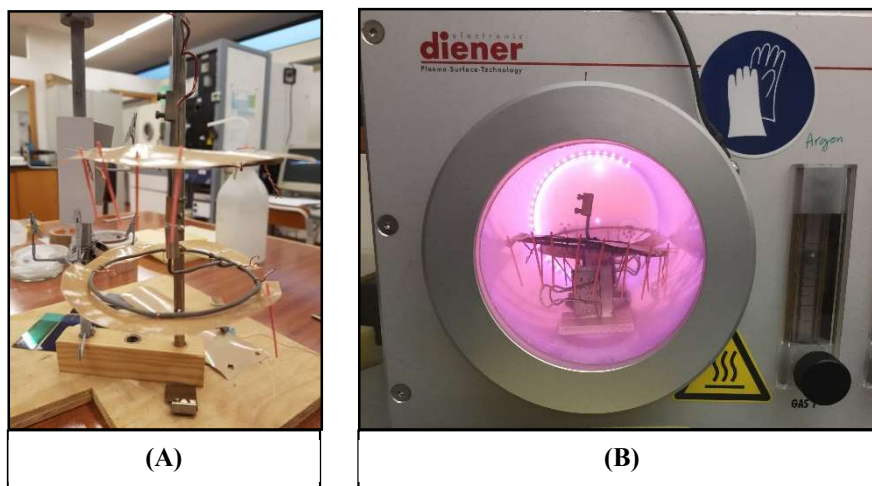
As condições de tratamento de plasma foram previamente testadas, tendo sido utilizadas as condições descritas por Alves,M.<sup>(8)</sup>

O plasma de Árgon (Ar) foi gerado a uma pressão de 90 Pa, aplicando uma potência de 100 W durante 2 minutos.

Após a disposição dos cones na câmara de baixa pressão, iniciou-se o bombardeamento com átomos de Ar que promoveu a supressão de partículas de carbono e oxigénio da superfície dos cones (**Figura 3**).

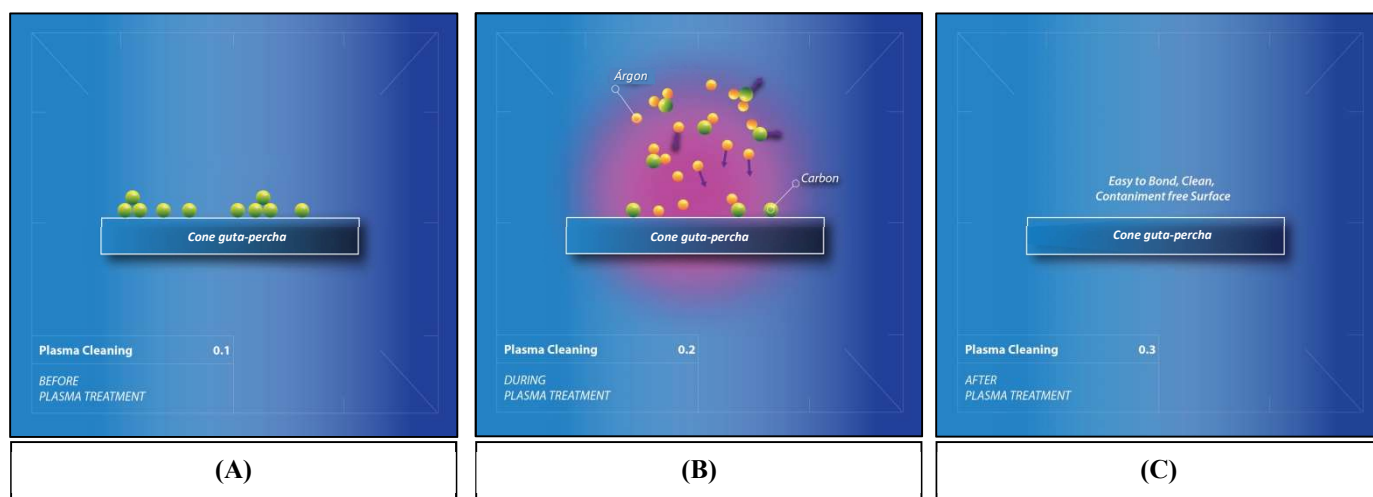


**Figura 1** - Equipamento para tratamento de plasma (*Diener Electronics*, modelo *Zepto*)



**Figura 2** – Porta - substratos construído para transporte de cones de guta-percha.

(A) Confeção porta-substratos; (B) Cones dispostos no porta-substratos durante o tratamento de plasma.



**Figura 3** – Esquema de tratamento com plasma de Árgon sob a superfície cone de guta-percha

(A) Superfície do cone antes do tratamento de plasma; (B) Superfície do cone durante o tratamento de plasma (Eliminação dos átomos de carbono durante o tratamento com plasma de árgon); (C) Superfície do cone após tratamento de plasma de Árgon (Superfície descontaminada). Adaptado de: <https://plasmatreatment.co.uk/henniker-plasma-technology/plasma-surface-technology/plasma-technology-what-is-plasma-treatment/plasma-cleaning/>



## 2.3 Revestimento com filme fino de TiO<sub>2</sub>

A deposição do filme fino de TiO<sub>2</sub> (Grupos 4 e 6) ocorreu através de um equipamento de pulverização catódica reativa por descarga em magnetrão de corrente contínua. Para este efeito, utilizou-se o sistema de deposição mostrado na **Figura 4**, localizado no Laboratório de Revestimentos Finos (LRF-III) do Departamento/Centro de Física da Universidade do Minho, campus de Azurém.

Este sistema é constituído, genericamente, por uma câmara de deposição com capacidade total de 0,06 m<sup>3</sup> e uma pré-câmara, um sistema de vácuo acoplado a esta, pelos vários controladores de fluxo de gases e temperatura, fontes de alimentação elétricas e ainda uma unidade controlo.

O vácuo primário da câmara, é conseguido através de uma bomba rotativa (*AEG, modelo AMME 80ZCA4*) acoplada à câmara de deposição, por sua vez, a pressão de base para iniciar as deposições, ou vácuo secundário, é obtida por uma bomba turbomolecular (*Alcatel, modelo ATP 400*). Para medir a pressão de gás no interior da câmara são utilizados medidores de pressão *Pfeiffer vacuum* (modelo *Compact FulRangeTM Gauge PKR251*) ligados a um mostrador digital da *Blazers Single Gauge*.

A reprodutibilidade do processo é conseguida através de um sistema de aquisição, com um multímetro digital *Agilent Technologies*, modelo *34970A* com um módulo multifuncional (*334907A*) que se encontra acoplado ao sistema de deposição. Este equipamento utiliza uma interface RS-232 e os dados foram adquiridos por um *software Benchlink Data Logger III*.<sup>(8)</sup>

Os ajustes dos valores dos fluxos de Ar e O<sub>2</sub> foram feitos manualmente, através de um controlador de fluxo *Bronkhorst High-Tech*, modelo *F201CV-500-AAD-33-V (EL-FLOW)*.

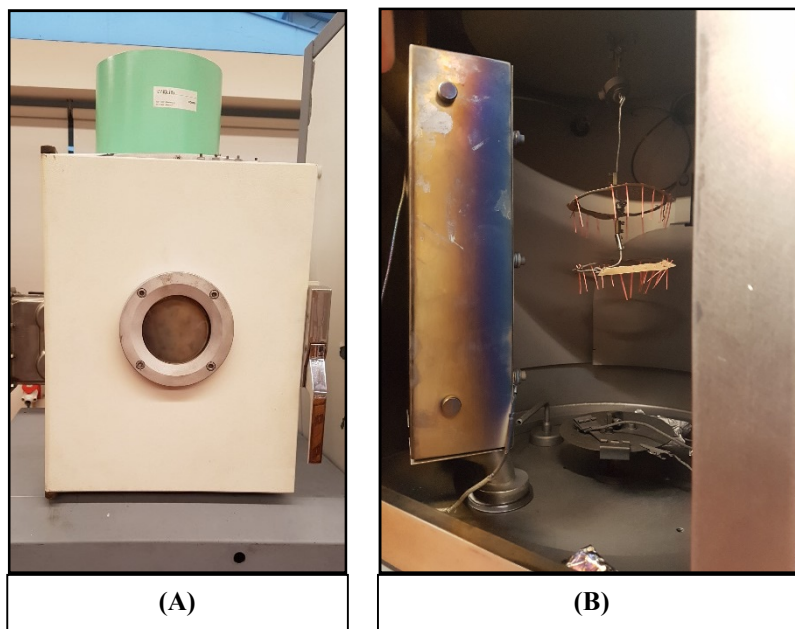
As condições usadas para deposição do filme fino encontram-se descritas na tabela abaixo:

**Tabela II** - Condições aplicadas no sistema de deposição de filme fino.

| Condição                            | Unidade de medida       |
|-------------------------------------|-------------------------|
| Pressão de base                     | 2x10 <sup>-5</sup> mbar |
| Fluxo de Árgon (Ar)                 | 25 sccm                 |
| Fluxo de Oxigénio (O <sub>2</sub> ) | 4 sccm                  |
| Densidade da corrente (DC)          | 1 A/m <sup>2</sup>      |
| Temperatura inicial                 | 25 °C                   |

O tempo de deposição total foi de 15 minutos.

Todo este processo de deposição provoca um aquecimento de substratos, perante isto, o tempo total de deposição foi dividido em 5 ciclos de 3 minutos com intervalos de 15 minutos entre cada um deles. Finda a deposição, foi realizado um tempo de arrefecimento de 20 minutos das amostras sendo posteriormente retiradas da câmara.



**Figura 4** – Câmara de deposição de filme fino de  $\text{TiO}_2$ , do Laboratório de Revestimentos Finos (LRF-III) do Departamento/Centro de Física da Universidade do Minho.

(A) Vista externa da câmara de deposição; (B) Vista interna da câmara de deposição, com o porta-substrato e cones de guta-percha

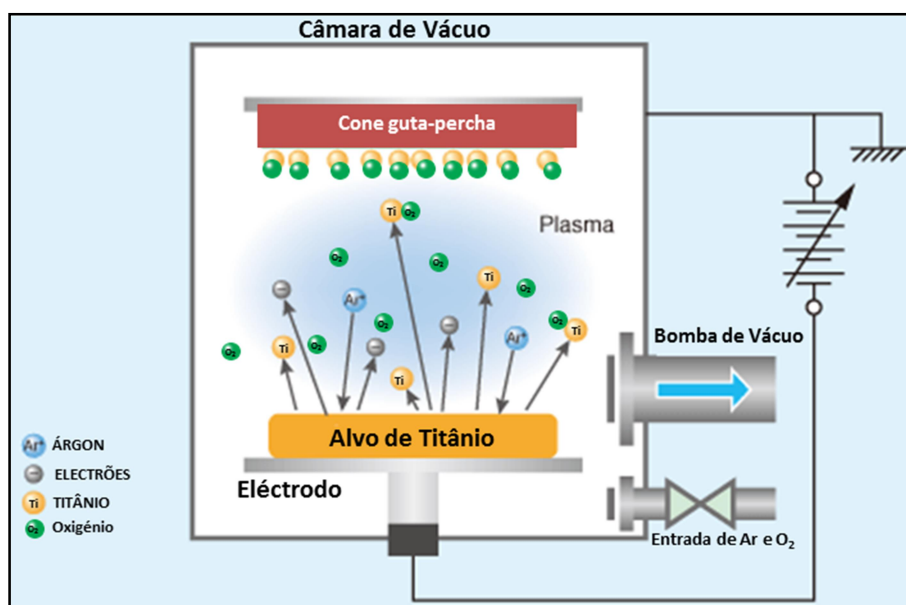
### 2.3.1 Procedimento revestimento com filme fino de dióxido de Titânio ( $\text{TiO}_2$ )

Inicialmente os cones são colocados no porta-substratos construído propositadamente para este efeito, adaptado à estrutura dos cones, de modo a que o revestimento seja depositado de forma uniforme por todos eles (**Figura 2 (A)**). Após efetuado o tratamento de plasma, os cones são transferidos para a câmara de deposição (**Figura 4**).

Para que o mecanismo de deposição do filme fino ocorra, primariamente dá-se um processo de vácuo até que se atinga a pressão de trabalho desejada, este processo poderá alargar-se até duas horas. Findo o processamento do vácuo, dá-se seguimento à deposição do filme fino de  $\text{TiO}_2$ .

É inserido na câmara um alvo de Titânio -Cátodo (-), e seguidamente o porta-substratos que irá comportar-se como sendo o ânodo (+); com isto estão criadas condições para que ocorra a deposição.

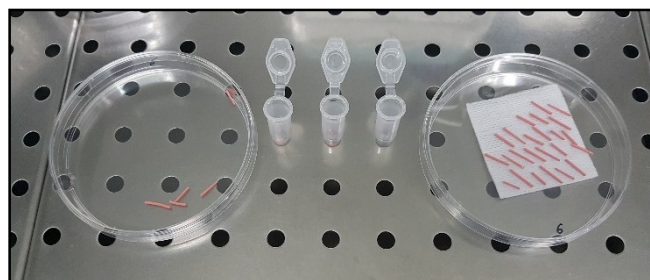
Procede-se ao bombardeamento de iões de Ar contra o alvo de Titânio, os quais vão potenciar a remoção de átomos de titânio que, por sua vez, se ligam ao oxigénio ( $O_2$ ) que é bombeado em simultâneo com o Ar, levando à formação de  $TiO_2$ . Como pretendemos a criação de um filme de  $TiO_2$ , é ativada juntamente com o árgon a libertação de  $O_2$  para que seja depositado, um filme fino, sobre a forma de dióxido de titânio na superfície do cone (Figura 5).



**Figura 5** – Esquema de deposição de filme fino de  $TiO_2$ . Adaptado de: [http://www.m-system.co.jp/newsletter/182/clip\\_contents.html](http://www.m-system.co.jp/newsletter/182/clip_contents.html)

## 2.4 Imersão em hipoclorito de sódio a 2,5 %

Os cones dos grupos 2, 5 e 6 foram imersos numa solução de hipoclorito de sódio ( $NaOCl$ ) a uma concentração de 2.5 %, durante 1 minuto (**Figura 6**). Finda esta imersão, foram colocados sobre uma gaze estéril para remoção de excessos de solvente durante 1 minuto.



**Figura 6** – Cones de guta-percha sobre gaze esterilizada após imersão em NaOCl 2,5%

## 2.5 Análise Microbiológica

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada através de culturas de *Candida albicans* (ATCC 10231). Iniciou-se pela preparação de uma suspensão de levedura de  $10^6$  UFC (unidades formadoras de colónias)/ml em *Sabouraud Soy Broth (SSB)*, sendo posteriormente esta suspensão incubada com os cones durante 24h a 37°C.

Para a quantificação das leveduras em suspensão (população planctónica), recolheu-se o sobrenadante e, de seguida, submeteu-se este à avaliação da atividade metabólica por resazurina. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3 um 10-óxido), é um método estável e não tóxico frequentemente utilizado para a quantificação celular. As células metabolicamente ativas, promovem a redução do composto de *resazurina* azul e não fluorescente num produto fluorescente e de cor rosa, a *resorufina*. Esta redução é proporcional ao número de células metabolicamente ativas presentes. <sup>(27)</sup> Para esta avaliação foi retirado 90µl de sobrenadante e adicionado 10 µl de resazurina, após 3h de incubação a 37°C, foi medida a intensidade de fluorescência a 530 nm e 590 nm, excitação e emissão respetivamente.

No que concerne à quantificação da população aderida (sésil), primariamente efetuaram-se 2 lavagens em PBS (Phosphate Buffered Saline) dos cones, seguindo-se um banho de ultra-sons (*Bandelin, Sonorex Digitec, 35kHz*) durante 10 minutos, para remoção destas populações. Realizadas diluições decimais das populações executou-se o plaqueamento em *Sabouraud Agar (SA)* por um período de 24h a 37°C, seguido da contagem do número de colónias (UFC/ml). Simultaneamente, foi avaliada e quantificada a população sésil pelo método da resazurina, como anteriormente descrito.

## 2.6 Análise de Citocompatibilidade (Método Direto)

A avaliação da citocompatibilidade foi avaliada com recurso a células fibroblásticas da linhagem celular L929. Procedeu-se, inicialmente, à preparação de uma suspensão celular de  $10^4$  células/cm<sup>2</sup> num meio mínimo essencial ( $\alpha$ - MEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 units/ml de penicilina / 100  $\mu$ /gr estreptomicina e 2,5 $\mu$ /gr de anfotericina B. Esta suspensão, foi incubada com os cones respeitantes a cada grupo, por um período de 1, 2 e 5 dias, a 37°C numa atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Realizou-se a avaliação da atividade metabólica das células por 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) e, 3 horas depois, observou-se a morfologia e distribuição celular nos cones com o auxílio de uma lupa de grande ampliação, para cada tempo indicado. Este método é comumente utilizado para medir citotoxicidade celular, tem por base atividade das enzimas oxidoredutases dependentes de NADPH que reduzem o MTT em cristais formazano insolúvel, conferindo uma cor púrpura.<sup>(28-30)</sup> Seguidamente à recolha fotográfica, dissolveram-se os cristais com DMSO (Dimethyl Sulfoxide) durante 15 min, procedendo-se à análise da absorvância a 550nm.



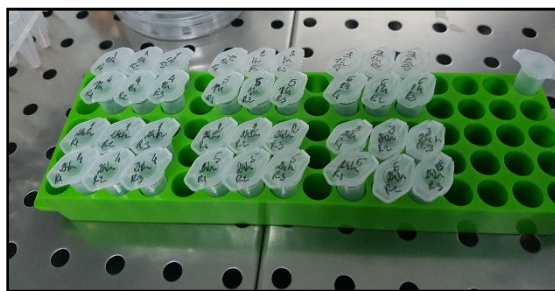
**Figura 7** – Meio preparado de  $\alpha$ -MEM.

## 2.7 Análise de Citocompatibilidade (Método Indireto)

---

A avaliação da citocompatibilidade pelo método indireto (lixiviados), permite avaliar existência ou não de citotoxicidade de substâncias libertadas pelo cone numa solução tampão. Iniciou-se com colocação dos cones respeitantes a cada grupo numa solução 0,7 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline), sendo posteriormente incubados a 37°C pelos períodos de 1 hora e 24 horas. Após estes períodos, foram retirados os sobrenadantes (lixiviados) e armazenados a -20°C.

Posteriormente, procedeu-se à preparação de uma cultura celular de  $10^4$  células/cm<sup>2</sup> de células fibrobláticas L929 por 24h, findo este período foi adicionado a estas o lixiviado de 1 e 24 horas. A atividade metabólica foi avaliada após 1,2 e 5 dias pelo método de MTT, anteriormente descrito.



**Figura 8** – Cones de guta-percha em solução de PBS, distribuídos pelos diferentes time points 1h e 24 h

## 2.8 Análise Estatística

---

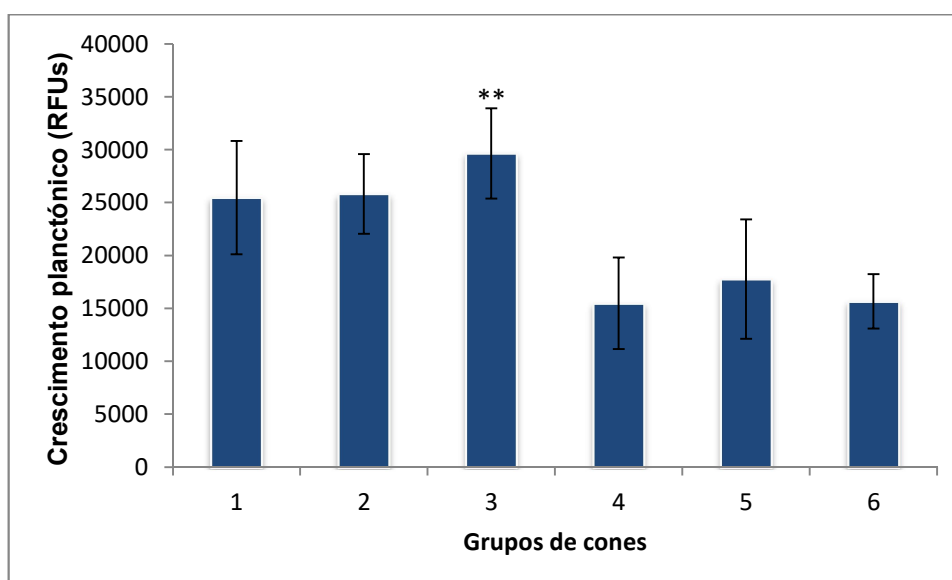
Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) entre os grupos experimentais. Para a comparação das médias, foi aplicado o teste de *Turkey* considerando o nível de significância de 0,05. A realização destes testes foi efetuada no programa *IBM SPSS Statistic, versão 24*.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Análise Microbiológica

Relativamente ao estudo do efeito antifúngico, os resultados obtidos nos cones experimentais em relação à atividade metabólica, por resazurina, da população planctónica de *Candida albicans*, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas relativamente ao grupo controlo (Grupo 1- controlo) e os restantes grupos. (Gráfico1)

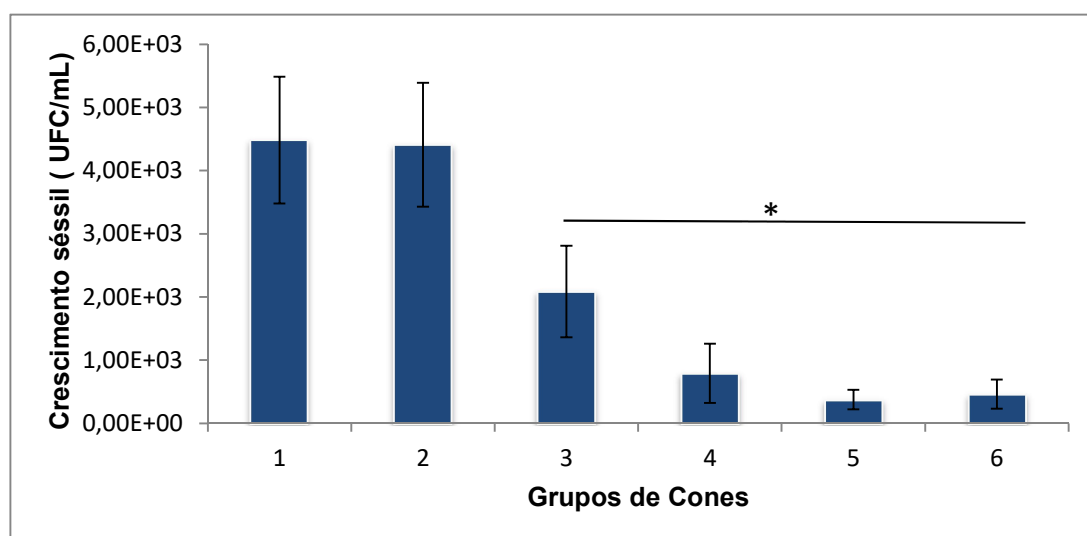
Contudo, os cones do grupo 3 (tratamento de plasma), quando comparados com os grupos 4 e 6, mostram ter um efeito mais reduzido quando à inibição do crescimento desta população. ( $p < 0,05$ )



**Gráfico 1-** Crescimento planctónico de *C. albicans* na presença de cones de guta-percha avaliado por resazurina (RFUs- Relative Fluorescence Units ; \*\*  $p < 0,05$  em relação aos grupo 4 e 6 ).

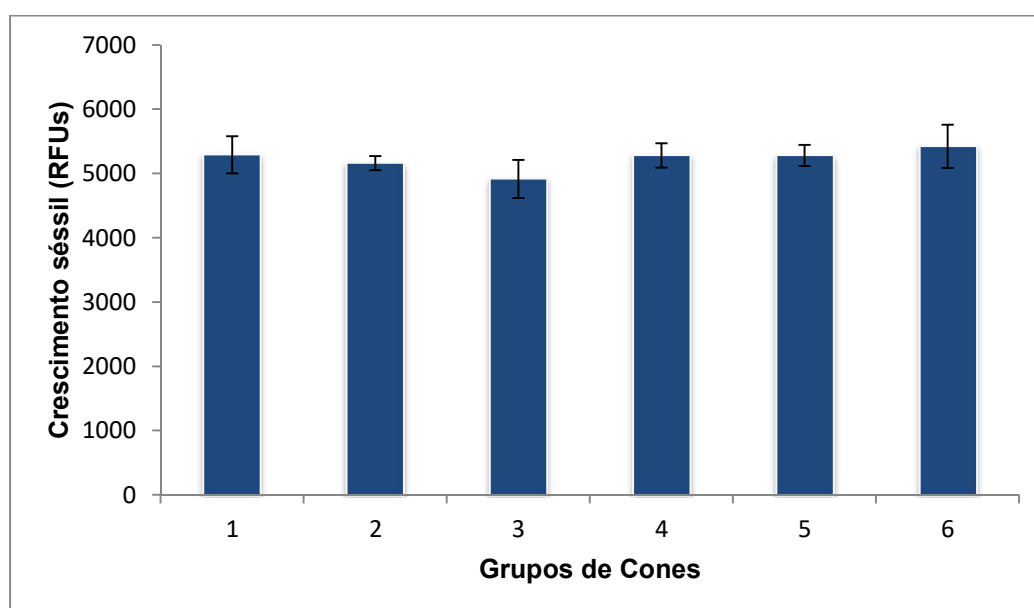
No que concerne às populações sésseis de *C. albicans*, aferidas a partir da medição das UFC/ml (**Gráfico 2**), verifica-se que os cones com tratamento de plasma (Grupo 3), cones com tratamento de plasma e revestimento de  $\text{TiO}_2$  (Grupo 4), cones com tratamento de plasma e imersão em NaOCl a 2,5 % (Grupo 5) e os cones com tratamento de plasma, revestimento de  $\text{TiO}_2$  e imersão em NaOCl a 2,5 % (Grupo 6) conduzem a uma redução estatisticamente significativa de população séssil, quando comparados com o grupo 1 (controlo).

Não se verificam, diferenças ao nível da inibição do crescimento séssil de leveduras no grupo de cones sem revestimento (Grupo 1) e imersão em hipoclorito a 2,5% (Grupo 2).



**Gráfico 2-** Crescimento séssil de *C. albicans* na presença de cones de guta-percha avaliado por UFC/ml (\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo 1 – grupo cones convencionais sem revestimento).

A avaliação da população séssil pelo método de resazurina não confirmou estas diferenças para os vários tratamentos de superfície, e tal deveu-se ao baixo número de leveduras aderidas aos cones, que faz com que os valores estejam abaixo do limite de deteção do método. (**Gráfico 3**)



**Gráfico 3-** Crescimento séssil de *C. albicans* na presença de cones de guta-percha avaliado por resazurina (RFUs- Relative Fluorescence Units).

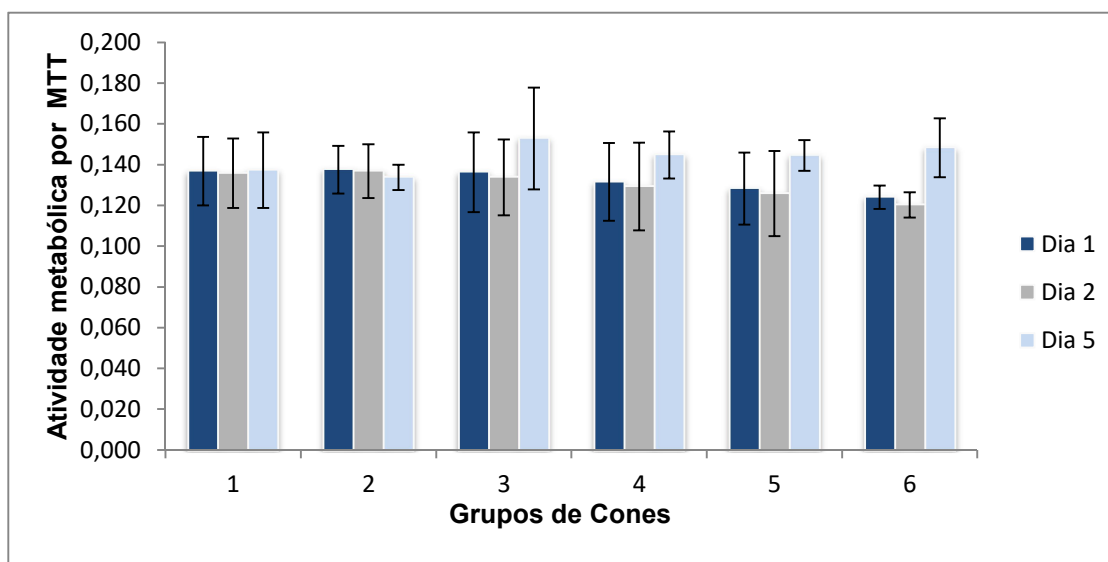


### 3.2 Análise de Citocompatibilidade (Método Direto)

Para a realização da análise de citocompatibilidade foram utilizados ensaios de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide) e de microscopia. (Gráfico 4)

Na análise do gráfico 4 é possível verificar que a viabilidade celular se apresentou semelhante para todos os tratamentos de superfície, isto é, não houve variação estatisticamente significativa da atividade metabólica de MTT ao longo dos dias testados em função dos tratamentos dos cones.

Apesar de não se verificarem estas diferenças é possível visualizar no gráfico que ao dia 5 as células, nos cones dos grupos 3 a 6, apresentam um ligeiro aumento, significativo, na atividade metabólica.

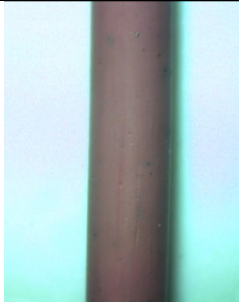
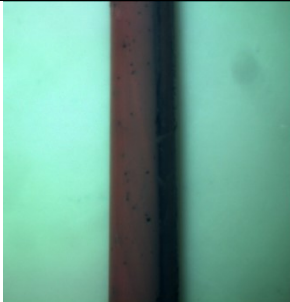
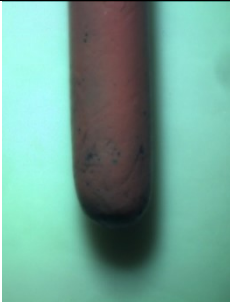


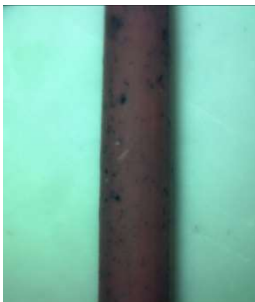


**Gráfico 4-** Atividade metabólica das células fibroblásticas L 929, após 1, 2 e 5 dias em contacto com os cones de guta-percha, avaliada por MTT a 550 nm.

A microscopia, auxilia na visualização da atividade do MTT, permitindo a coloração escura conferida por este, ver as células que recobrem a superfície do cone. Este recobrimento celular confirma a biocompatibilidade do material.

As figuras 9 e 10, ilustram a título exemplificativo a adesão celular em cones com tratamento de plasma e o revestimento de  $\text{TiO}_2$  e em cones convencionais (controlo).

**Tabela III** – Tabela resumo com figuras representativas da adesão celular conferida pelo tratamento de plasma e revestimento de  $\text{TiO}_2$ , em relação aos cones convencionais, pelos dias 1, 2 e 5.

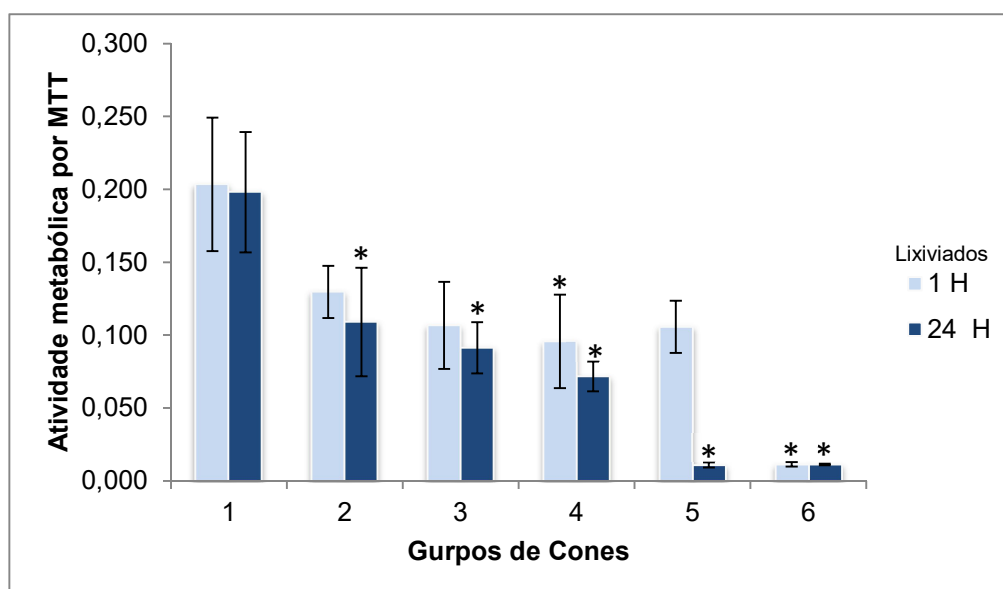
| 1 Dia  | 2 Dia  | 5 Dia   |
|--|--|---|
|  <p><b>Figura 9 (A)</b> – Cone guta-percha convencional após ensaio MTT- Dia 1 (ampliação 10x)</p>  |  <p><b>Figura 9 (B)</b> – Cone guta-percha convencional após ensaio MTT- Dia 2 (ampliação 10x)</p>  |  <p><b>Figura 9 (C)</b> – Cone guta-percha convencional após ensaio MTT- Dia 5 (ampliação 10x)</p>   |
|  <p><b>Figura 10 (A)</b> – Cone guta-percha com tratamento de plasma e revestimento com <math>\text{TiO}_2</math> após ensaio MTT- Dia 1 (ampliação 10x)</p> |  <p><b>Figura 10 (B)</b> – Cone guta-percha com tratamento de plasma e revestimento com <math>\text{TiO}_2</math> após ensaio MTT- Dia 2 (ampliação 10x)</p> |  <p><b>Figura 10 (C)</b> – Cone guta-percha com tratamento de plasma e revestimento com <math>\text{TiO}_2</math> após ensaio MTT – Dia 5 (ampliação 10x)</p> |

### 3.3 Análise de Citocompatibilidade (Método Indireto)

Pela análise do gráfico 5, observa-se que, os grupos 4 e 6 se apresentam uma redução estatisticamente significativa da atividade metabólica, na presença de lixiviados respeitantes à 1 hora e às 24 horas, relativamente aos cones convencionais. ( $p < 0.05$ )

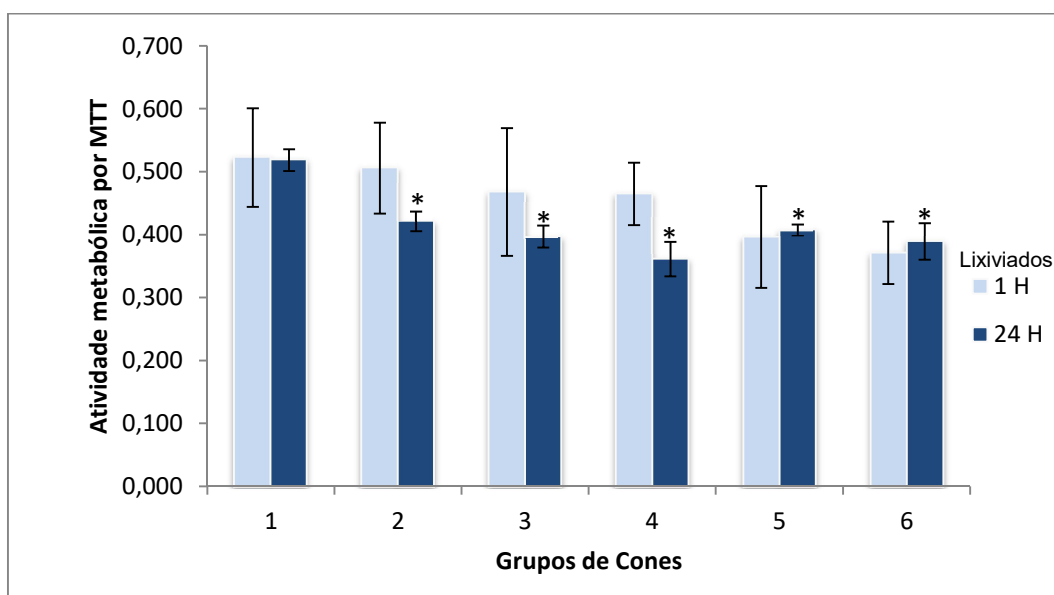
Os cones pertencentes aos grupos 2, 3 e 4 não demonstram diferenças estatísticas desta atividade quando comparados com os cones convencionais com o lixiviado de 1 hora, apenas os cones dos grupos 4 e 6 o mostram.

Porem, na presença do sobrenadante de 24 horas o mesmo não acontece, encontrando-se uma diminuição desta atividade em todos os tratamentos em contraste com o grupo 1. ( $p < 0,02$ )



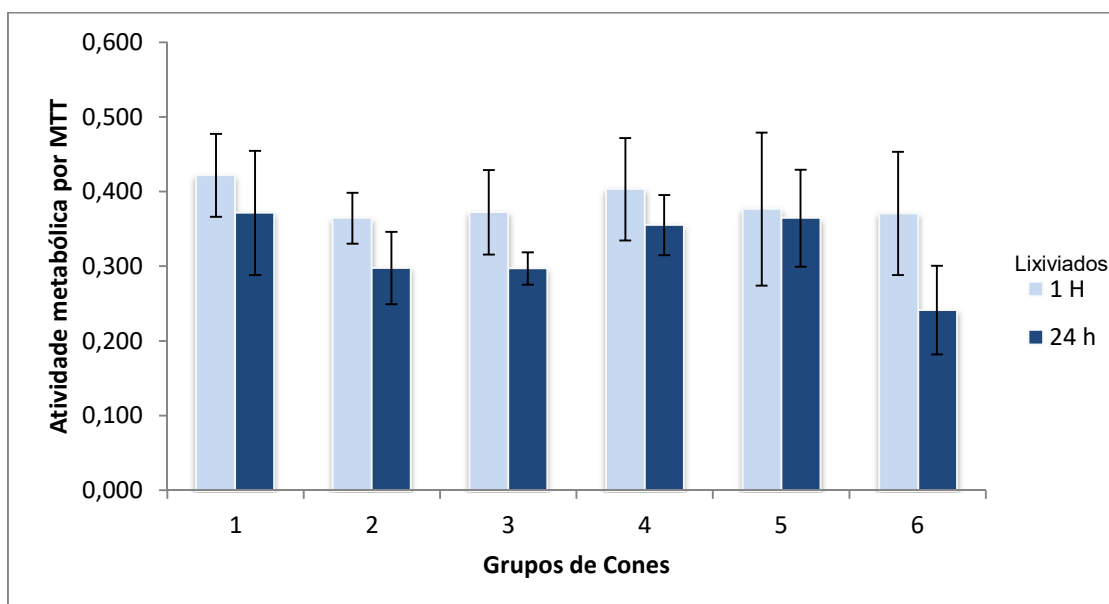
**Gráfico 5-** Atividade metabólica das células fibroblásticas L 929, após contacto com lixiviado de 1h e 24h - Dia 1 (Avaliação por MTT a 550nm, \* $p < 0,05$  em comparação com cones grupo 1).

No gráfico 6, constata-se que ao dia 2 de contacto das culturas celulares com o lixiviado de 1 hora, não ocorre uma redução da atividade metabólica de MTT. No contacto celular com o lixiviado de 24 horas, averiguou-se que todos os grupos se apresentam mais citotóxicos em relação aos cones convencionais, i.e, todos os grupos induzem uma diminuição da atividade metabólica de MTT, significando que as células fibroblásticas têm dificuldade em se reproduzir. ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 6-** Atividade Metabólica das células fibroblásticas L 929, após contacto com lixiviado 1h e 24h – Dia 2 (Avaliação por MTT a 550 nm,  $*p < 0,05$  em comparação com cones grupo 1).

Por último, no dia 5 (**Gráfico 7**) a atividade metabólica celular dos grupos 2 a 6, quando equiparada à do grupo 1, não é afetada pela presença dos lixiviados 1 e 24 h, sugerindo a redução de citotoxicidade dos tratamentos de superfície e uma melhor adaptação celular ao meio, permitindo a sua reprodução.



**Gráfico 7-** Atividade Metabólica das células fibroblásticas L 929, após contacto com lixiviado 1h e 24h – Dia 5 (Avaliação por MTT a 550 nm).

## 4. DISCUSSÃO

---

O objetivo do presente estudo foi a avaliação do efeito antifúngico de cones de guta-percha revestidos com nanoparticulado de dióxido de titânio, em filme fino, e sua citocompatibilidade, comparativamente aos cones de guta comercializados.

A análise dos resultados demonstrou que os cones com tratamento de plasma e revestimento com filme fino de  $\text{TiO}_2$ , apresentam um efeito inibitório no crescimento de populações sésseis de *Candida albicans*. No que diz respeito à citocompatibilidade avaliada pelo contacto direto dos cones com as culturas celulares, bem como pelo método indireto, após contacto com lixiviados de 1h e 24h, estes não apresentam níveis de citotoxicidade, superiores ao grupo controlo. No método indireto apesar de existir evidência de maior citotoxicidade dos cones revestidos no contacto inicial, verificou-se, uma recuperação celular ao final do dia 5 de contacto, semelhante ao grupo controlo.

Alguns autores têm-se dedicado à análise da citotoxicidade das NP de  $\text{TiO}_2$ , estes indicam que o aumento da utilização recorrente destas NP, devido à sua ampla aplicabilidade seja na construção civil, na indústria cosmética ou até mesmo na alimentação permite a exposição elevada do individuo a grandes quantidades destas nanopartículas. Evidenciam ainda quando expostos a quantidades elevadas destas NP o efeito da citotoxicidade torna-se mais evidente ao nível das células hepáticas.<sup>(18, 31, 32)</sup>

Estes factos, não constituem um problema para o estudo e aplicabilidade em causa, uma vez que, os cones revestidos com estas NP não vão potenciar ao individuo uma exposição elevada a estas nanopartículas.

Na avaliação do efeito antifúngico, no que diz respeito às populações planctónicas avaliadas por resazurina, verificou-se que os grupos que foram alvo de tratamento de plasma (Grupo 3) e associação com revestimento de filme fino de  $\text{TiO}_2$  (Grupo 4), hipoclorito de sódio a 2,5% (Grupo 5) ou estes dois últimos em simultâneo (Grupo 6) não apresentam uma tendência de ação inibitória do crescimento planctónico de *C. albicans*, comparativamente aos cones convencionais.

A imersão com hipoclorito de sódio 2,5 % do cone com tratamento de plasma e revestimento de  $\text{TiO}_2$  (Grupo 6) não parece potenciar o efeito do tratamento de plasma. É ainda possível analisar que ação do hipoclorito de sódio a 2,5 % (Grupo 2), não apresenta atividade antifúngica em relação aos cones convencionais.

Atualmente, não existe consenso sobre o imperativo da descontaminação dos cones de guta-percha previamente à sua utilização, sendo opinião de alguns autores que esta seria desnecessária devido às suas propriedades antimicrobianas ou às propriedades antibacterianas do cimento obturador.<sup>(2, 3)</sup> No entanto, de um modo geral, a esterilização ou desinfecção dos cones de guta-percha é recomendada antes da sua introdução nos canais radiculares. Vários métodos têm sido propostos para a descontaminação rápida de cones de guta-percha, sendo os mais divulgados a imersão, durante curtos períodos de tempo, em soluções de hipoclorito de sódio a diferentes concentrações ou cloroheixidina.<sup>(2-4)</sup> Alguns autores afirmam ainda que esses agentes desinfetantes utilizados produzem alterações na superfície dos cones, as quais se refletem nas propriedades físicas dos mesmos, comprometendo a qualidade da obturação.

Sundqvist *et al*, refere que quando os dentes são alvo de tratamento endodôntico sob condições assépticas e de acordo com princípios clínicos aceitos, a taxa de sucesso é geralmente alta. A maioria dos estudos de *follow-up* relata taxas de sucesso global de 85% a 90% sobre a terapia endodôntica, em dentes com polpa viva, baixando essa taxa cerca de 20% em dentes com polpa necrosada/infetada.<sup>(33)</sup> Quando ocorre uma quebra da cadeia asséptica permitimos a infiltração de microrganismos oportunistas nos canais radiculares, potenciando assim o desenvolvimento de infecção.

A *Candida albicans*, é o fungo mais frequentemente isolado e prevalente associado a este tipo de infecções.<sup>(6, 9, 11, 22)</sup> Estudos de Nair *et al*, referenciam que das 9 biópsias realizadas a dentes de pacientes com terapia resistente a lesões periapicais, 2 apresentavam-se com a presença deste fungo, realçando que este em associação com outros microrganismos potencia o desenvolvimento de infecções secundárias.<sup>(34)</sup>

Um dos exemplos de quebras desta cadeia é a contaminação dos cones de guta-percha durante a sua manipulação ou o processo deficiente de desinfecção destes, permitindo assim que microrganismos como os fungos possam alojar-se nos materiais de obturação permitindo a persistência da infecção.

Daí que, surja então a necessidade de conferir propriedades antimicrobianas a estes materiais de obturação, nomeadamente efeito antifúngico, que vise a inibição do desenvolvimento de alguns microrganismos oportunistas.

Estudos referem que o filme de nanoparticulado de TiO<sub>2</sub> é um material comumente utilizado para revestimentos de superfícies médicas, devido às suas propriedades antifúngicas, nomeadamente contra a *Candida albicans*.<sup>(19, 21, 22)</sup> Devido a isto, a escolha para avaliar o efeito antifúngico de cones de guta-percha quando

revestidos com um material potenciador desta ação, recaiu sobre este tipo de nanopartículado.

A imersão dos cones de guta-percha em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) é um dos meios até hoje mais efetivos, na diminuição da contaminação microbiana, sendo mais ativo para a população planctónica (suspensão).<sup>(35)</sup> O uso do NaOCl para o combate de fungos é muito recorrente e está descrito na literatura o seu uso com concentrações compreendidas entre 0,5% até 6%.<sup>(10, 13-15)</sup> No entanto, segundo Ndiaye *et al*, o uso de NaOCl a 2,5 % parece ser o melhor compromisso entre a eficiência de eliminação deste microrganismo e ausência de toxicidade para o indivíduo.<sup>(16, 17)</sup>

No presente trabalho a solução de revestimento apresentada (filme fino de TiO<sub>2</sub>), não apresentou atividade contra a população planctónica. Contudo deve ser salientado que esta população é na sua maior parte eliminada com os procedimentos de instrumentação e irrigação com soluções antimicrobianas. O problema atual em Endodontia é conseguir um meio de desinfecção suplementar que possa inibir o crescimento dos microrganismos que persistem após a fase de preparação biomecânica e eventualmente a obturação, mantendo uma ação prolongada sem risco acrescido de toxicidade. O composto apresentado, não libertando substâncias antimicrobianas para a solução, não apresentou efeito na população planctónica, evidenciando que não há libertação de produtos, mas obteve uma ação mais eficaz sobre a população séssil, garantindo uma dificuldade de adesão dos microrganismos, ao longo do tempo. A resposta inicialmente menos favorável nos testes de citocompatibilidade (método indireto) foi anulada ao fim de um curto espaço de tempo (dia 5), não apresentando diferenças em relação ao grupo controlo.

Os grupos 3, 4, 5 e 6 foram submetidos a um tratamento primário de plasma de argon (Ar). O tratamento da superfície através do plasma é uma das formas mais eficientes para o tratamento de polímeros, uma vez que este modifica seletivamente as propriedades químicas e físicas da superfície, não afetando porém as características originais do polímero em si. Promove a remoção da camada orgânica desta superfície, aumentando a densidade de poros e maior adesão do revestimento do filme fino de TiO<sub>2</sub>.<sup>(36, 37)</sup> O seu uso está ainda indicado na esterilização de materiais, removendo os biofilmes, superiorizando-se aos desinfetantes convencionais, sem capacidade de penetrar e inativar biofilmes.<sup>(38)</sup>

O efeito antifúngico na população séssil, apresentado pelos cones com tratamento de plasma, isoladamente (Grupo 3), corroborado por Frike *et al*, não tem relevância para a

clínica uma vez que este efeito só ocorre nas 2h seguintes ao tratamento ligando-se posteriormente a hidrocarbonetos, perdendo a sua ação. <sup>(38)</sup>

No presente trabalho a imersão em NaOCl não aumentou atividade antifúngica dos cones.

Assim podemos afirmar que o revestimento de TiO<sub>2</sub> depois do tratamento de plasma é o melhor tratamento apresentando uma ação antifúngica relevante, superior à dos cones convencionais, particularmente da população séssil. Não foi avaliado o efeito do revestimento de TiO<sub>2</sub> isoladamente (sem tratamento prévio de plasma) uma vez que este revestimento tem a sua potencialidade máxima quando aplicado após o tratamento de plasma, não sendo preconizado o seu uso isolado.

Em relação à avaliação por resazurina devido ao baixo número de colónias aderidas aos cones os valores ficaram abaixo do limite de deteção do método, não permitindo que estes fossem considerados. Segundo Driessche o intervalo do método é restrito e o limite inferior de quantificação é de aproximadamente 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colónias (UFC) por biofilme, bem inferior ao verificado. <sup>(27)</sup>

Byunghoon Kim *et al* <sup>(26)</sup> e Maness *et al* <sup>(39)</sup> descrevem o efeito antimicrobiano do nanoparticulado de TiO<sub>2</sub> através da sua ação na oxidação dos ácidos polinsaturados constituintes da membrana fosfolipídica. Estas promovem a produção e libertação de radicas de hidroxilo e espécies reativas de oxigénio (ROS) e consequentemente a desintegração da membrana, culminando com a morte do microrganismo. <sup>(40-43)</sup>

Podemos então concluir que a presente investigação cumpriu os objetivos permitindo propor uma nova abordagem para a manutenção da cadeia asséptica, através do revestimento dos cones de guta-percha com um filme fino de TiO<sub>2</sub>. Esta solução, agora comprovada, poderá coadjuvar na prevenção de infeção por *Candida albicans* dificultando a sua adesão, mecanismo primário no desenvolvimento de biofilme nos sistemas de canais radiculares, prevenindo o desenvolvimento de uma possível infeção secundária, e consequentemente reduzir o risco de desenvolvimento ou persistência de periodontite apical.



## 5. CONCLUSÃO

---

Os cones com tratamento de plasma e revestimento de nanopartículas de dióxido de titânio demonstram efeito inibitório no crescimento de populações sésseis de *Candida albicans*, o que demonstra uma importância relevante para o estudo em causa, uma vez que, a população aderida é a principal causadora de uma infecção secundária. Quanto à citocompatibilidade, o revestimento em causa apresenta um perfil da viabilidade celular semelhante a todos os outros tratamentos de superfície.

Este revestimento de filme fino com nanoparticulado de  $\text{TiO}_2$  revela-se promissor na prevenção da contaminação dos cones de guta-percha por uma população séssil, propondo-se assim que a utilização deste poderá constituir para um maior sucesso endodôntico e na minoração de futuras complicações que advenham deste. Outros estudos deverão ser realizados, aferindo as propriedades mecânicas dos cones revestidos bem como a análise de superfície após imersão em solução de hipoclorito de sódio.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Nirupama DN, Nainan MT, Ramaswamy R, Muralidharan S, Usha HH, Sharma R, et al. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Efficacy of Four Endodontic Biomaterials against *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, and *Staphylococcus aureus*. *Int J Biomater*. 2014;383756(10):12.
2. Pina-Vaz I, Espinar MJ, Noites R, Fontes de Carvalho M. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of different antiseptics on contaminated gutta-percha cones. *Rev Clín Pesq Odontol*. 2008;4(3):153-9.
3. Pang NS, Jung IY, Bae KS, Baek SH, Lee WC, Kum KY. Effects of short-term chemical disinfection of gutta-percha cones: identification of affected microbes and alterations in surface texture and physical properties. *J Endod*. 2007;33(5):594-8.
4. Nabeshima CK, Machado ME, Britto ML, Pallotta RC. Effectiveness of different chemical agents for disinfection of gutta-percha cones. *Aust Endod J*. 2011;37(3):118-21.
5. Seabra Pereira OL, Siqueira JF, Jr. Contamination of gutta-percha and Resilon cones taken directly from the manufacturer. *Clin Oral Investig*. 2010;14(3):327-30.
6. Waltimo TM, Siren EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997;30(2):96-101.
7. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod*. 2000;26(12):695-8.
8. Alves MJTFT. Efeito antimicrobiano e propriedades físicas de cones de gutta-percha revestidos com nanopartículas de óxido de Zinco: Faculdade Medicina Dentária da Universidade do Porto; 2016.
9. Ashraf H, Samiee M, Eslami G, Ghodse Hosseini MR. Presence of *Candida Albicans* in Root Canal System of Teeth Requiring Endodontic Retreatment with and without Periapical Lesions. *Iran Endod J*. 2007;2(1):24-8.
10. Waltimo TM, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J*. 1999;32(6):421-9.
11. Kumar J, Sharma R, Sharma M, Prabhavathi V, Paul J, Chowdary CD. Presence of *Candida albicans* in Root Canals of Teeth with Apical Periodontitis and Evaluation of their Possible Role in Failure of Endodontic Treatment. *J Int Oral Health*. 2015;7(2):42-5.
12. Persoon IF, Crielaard W, Ozok AR. Prevalence and nature of fungi in root canal infections: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2016;17(10):12730.
13. Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *J Endod*. 2002;28(2):68-71.
14. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod*. 1999;25(4):235-8.

15. Jose J, Krishnamma S, Peedikayil F, Aman S, Tomy N, Mariodan JP. Comparative Evaluation of Antimicrobial Activity of QMiX, 2.5% Sodium Hypochlorite, 2% Chlorhexidine, Guava Leaf Extract and Aloevera Extract Against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* - An in-vitro Study. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(5):1.
16. Ndiaye D, Diongue K, Bane K, Seck A, Niang SO, Leye Benoist F, et al. [Efficacy of sodium hydroxide at 2.5 %, chlorhexidine gluconate at 0.5 % and calcium hydroxide against *Candida albicans*]. *J Mycol Med*. 2016;26(4):317-22.
17. Ndiaye D, Diongue K, Bane K, Niang SO, Toure B. [Presence of yeasts in primary endodontic infections and study of their susceptibility to disinfection with sodium hypochlorite at 2.5]. *J Mycol Med*. 2016;26(2):111-5.
18. Tomankova K, Horakova J, Harvanova M, Malina L, Soukupova J, Hradilova S, et al. Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles in vitro. *Food Chem Toxicol*. 2015;82:106-15.
19. Allaker RP, Memarzadeh K. Nanoparticles and the control of oral infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(2):95-104.
20. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10(15):1743-8977.
21. Chidambaranathan AS, Mohandoss K, Balasubramaniam MK. Comparative Evaluation of Antifungal Effect of Titanium, Zirconium and Aluminium Nanoparticles Coated Titanium Plates Against *C. albicans*. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(1):1.
22. Haghighi F, Roudbar Mohammadi S, Mohammadi P, Hosseinkhani S, Shipour R. Antifungal Activity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and EDTA on *Candida albicans* Biofilms. *Infection, Epidemiology and Medicine*. 2013;1(1):33-8.
23. Siti Hajar Othman NRAS, Norhazlizam Zainal, Roseliza Kadir Basha, Rosnita. Antimicrobial Activity of TiO<sub>2</sub> Nanoparticle-Coated Film for Potential Food Packaging Applications. *International Journal of Photoenergy*. [Research Article]. 2014:6.
24. Dizaj SM, Lotfipour F, Barzegar-Jalali M, Zarrintan MH, Adibkia K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;44:278-84.
25. Ravishankar Rai V, A JB. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. A. Mendez-Vilas ed. Spain: FORMATEX; 2011.
26. Kim B, Kim D, Cho D, Cho S. Bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalyst on selected food-borne pathogenic bacteria. *Chemosphere*. 2003;52(1):277-81.
27. Van den Driessche F, Rigole P, Brackman G, Coenye T. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *J Microbiol Methods*. 2014;98:31-4.

28. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
29. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods*. 1990;131(2):165-72.
30. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*. 1986;94(1-2):57-63.
31. Heringa MB, Geraets L, van Eijkeren JC, Vandebriel RJ, de Jong WH, Oomen AG. Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations. *Nanotoxicology*. 2016;10(10):1515-25.
32. Konstantinova V, Ibrahim M, Lie SA, Birkeland ES, Neppelberg E, Marthinussen MC, et al. Nano-TiO<sub>2</sub> penetration of oral mucosa: in vitro analysis using 3D organotypic human buccal mucosa models: *J Oral Pathol Med*. 2017 Mar;46(3):214-22. Epub 2016 Jul 8 doi:10.1111/(ISSN)1600-0714 10.1111/jop.12469.
33. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(1):86-93.
34. Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod*. 1990;16(12):580-8.
35. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2000;26(6):331-4.
36. Yoshida S, Hagiwara K, Hasebe T, Hotta A. Surface modification of polymers by plasma treatments for the enhancement of biocompatibility and controlled drug release. *Surface and Coatings Technology*. 2013;233:99-107.
37. Moon M-W, Vaziri A. Surface modification of polymers using a multi-step plasma treatment. *Scripta Materialia*. 2009;60(1):44-7.
38. Fricke K, Koban I, Tresp H, Jablonowski L, Schroder K, Kramer A, et al. Atmospheric pressure plasma: a high-performance tool for the efficient removal of biofilms. *PLoS One*. 2012;7(8):6.
39. Maness PC, Smolinski S, Blake DM, Huang Z, Wolfrum EJ, Jacoby WA. Bactericidal Activity of Photocatalytic TiO<sub>2</sub> Reaction: toward an Understanding of Its Killing Mechanism: *Appl Environ Microbiol*. 1999 Sep;65(9):4094-8.
40. Xing Y, Li X, Zhang L, Xu Q, Che Z, Li W, et al. Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the antibacterial and physical properties of polyethylene-based film. *Progress in Organic Coatings*. 2012;73(2-3):219-24.

41. Cho M, Chung H, Choi W, Yoon J. Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection. *Water Research*. 2004;38(4):1069-77.
42. Kühn KP, Chaberny IF, Massholder K, Stickler M, Benz VW, Sonntag H-G, et al. Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light. *Chemosphere*. 2003;53(1):71-7.
43. Maneerat C, Hayata Y. Antifungal activity of TiO<sub>2</sub> photocatalysis against *Penicillium expansum* in vitro and in fruit tests. *International Journal of Food Microbiology*. 2006;107(2):99-103.

# 7. ANEXOS

---

## Anexo 1- Declaração de autoria do trabalho

---

**U. PORTO**



FACULDADE DE  
MEDICINA DENTÁRIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

### DECLARAÇÃO Monografia de Investigação

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia de investigação, integrado no MIMD da FMDUP, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

Porto, 24 de maio de 2017

(Ricardo Picão Fernandes)

## Anexo 2- Parecer Orientador

---

**U.PORTO**



FACULDADE DE  
MEDICINA DENTÁRIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

### PARECER

(Entrega do trabalho final de Monografia)

Informo que o trabalho de Monografia desenvolvido pelo Estudante Ricardo Picão Fernandes como o título: *“Efeito antifúngico de cones de guta-percha revestidos com nanopartículas de dióxido de titânio”*, está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 24 de maio de 2017

*Irene Pina Vaz*

---

(Professora Doutora Irene Pina Vaz)